Robust Tn5 转座酶

Version20171009

产品组分

组分	#M0221	#M0222
Robust Tn5转座酶 (1 U/μl)	25 μl	25 μl × 5
5× LM缓冲液	1.0 ml	1.0 ml × 5
10× TPS缓冲液	0.1 ml	0.1 ml × 5

产品说明

概述：Robust Tn5转座酶是野生型Tn5转座酶的高活性突变体，可以高效的将Tn5转座子插入到目标序列。Robust Tn5转座酶识别Tn5转座子酶序列的内端（inside end，IE）、外端（outside end，OE）和嵌合端（mosaic end，ME）序列，含有ME序列片段的体外转座效率最高[1]。Robust Tn5转座酶的插入位点具有很高的随机性[2]，因此被广泛的用于体外转基因（外源基因整合到宿主细胞）和二代测序建库等领域。

来源：含有Robust Tn5转座酶序列的大肠杆菌菌株。

应用：体外转基因（外源基因整合到宿主细胞），二代测序建库。

贮存溶液：50 mM Tris-HCl (pH 8.0 @ 25 °C)，100 mM NaCl，0.1 mM EDTA，0.1% Triton X-100和50%甘油(V/V)。

反应缓冲液(随酶提供)：5× LM 缓冲液、10× TPS 缓冲液。

单位定义：1单位Robust Tn5转座酶指37°C条件下反应1小时，完全切割1 μg含有识别序列的DNA片段所需要的酶量。

质量控制检测

核酸外切酶活性：50 μl反应体系中，20 U本酶与1 μg的Hind III消化的λDNA于37°C温育4小时，DNA的电泳条带无明显变化。

RNase活性：50 μl反应体系中，100 U本酶与250 ng大肠杆菌rRNA于37°C温育2小时，琼脂糖电泳检测，被降解的rRNA小于1%。

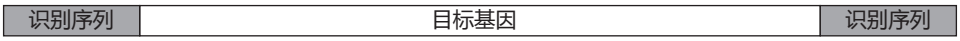
参考文献

1. Zhou, M., Bhasin, A., and Reznikoff, W. S. (1998) J. Mol. Biol. 276, 913-925.
2. Ason, B., Reznikoff, W. S. (2004) J. Mol. Biol. 335, 1213-1225.

应用

1 体外转基因操作:

Robust Tn5转座酶能将含有成对识别序列的双链DNA片段（如下图所示）随机整合到宿主细胞的基因组中。整合的过程分为两步：首先，Robust Tn5转座酶同含有识别序列的目标基因片段（一般包含选择标记）结合，形成转座体（Transposome）；之后通过转化的方式将转座体导入宿主细胞，目标基因将会被整合到宿主细胞基因组中，最后利用选择标记筛选成功整合目标基因的宿主细胞。



当识别序列为ME接头时，上述双链DNA片段的正义链序列为：

5′-CTGTCTCTTATACACATCT+目标基因+AGATGTGTATAAGAGACAG-3′

1.1 转座体（Transposome）的构建

1.1.1 准备如下反应体系（该反应体系可根据需要进行放大）：

成分	体积
目标基因片段(含成对识别序列,100 μg/ml)	2 μl
Robust Tn5转座酶	4 μl
100%甘油	2 μl

1.1.2 充分混匀，室温（25 °C ）放置30分钟。

1.1.3 取1-4 μl反应产物进行后续的转化实验，反应产物也可放置于-20°C备用（转座体可以在-20°C稳定储存一年时间）。

1.2 转化

请使用电击转化法进行转化。转化后利用选择性标记筛选成功整合目标基因的宿主细胞。

订购热线：022-83718125-639
Email：sales@robustnique.com
QQ：1686283770 微信：13642033949

天津强微特生物科技有限公司
地址：天津市滨海高新区兰苑路留学生创业园工房时代写字楼II期C座331室
网址：www.robustnique.com
传真：022-83718172-610 022-83718175-610

技术支持：022-83718125
Email：supports@robustnique.com
QQ：3133506257 微信：18630818650

应用

2. 二代测序建库

2.1 转座体(Transposome)的构建

2.1.1. 准备如下的反应体系（识别序列以ME为例）

名称	体积
连接有ME序列的接头* (10 pmol/μl)	1.5-4 μl
10× TPS 缓冲液	2 μl
Robust Tn5 转座酶	3-4 μl
水	至20 μl

[*]：接头中ME序列必须为双链，且末端磷酸化，例如：

接头1（Phos表示磷酸化）：

5’-Phos-CTGTCTCTTATACACATCT

3’-GACAGAGAATATGTGTAGA+接头1

接头2（Phos表示磷酸化）：

5’-Phos-CTGTCTCTTATACACATCT

3’-GACAGAGAATATGTGTAGA+接头2

2.1.2. 将反应物混匀，25°C反应30分钟。

2.1.3. 反应后的Transposome转座体可立即进行后续反应，也可-20°C保存（转座体可以在-20°C稳定储存一年时间）。

2.2 片段化反应（Tagmentation）

2.2.1. 准备如下的反应体系（对照反应中的转座体用水代替）

名称	体积
人基因组DNA	~50 ng
5× LM 缓冲液	6 μl
转座体（Transposome）	4 μl
水	至30 μl

2.2.2. 37°C反应2h或55°C反应10~15分钟。

2.2.3. 如果片段化反应结果不理想（如片段较大），可以在转座体构建步骤变更ME序列和转座酶的用量，或者在片段化反应步骤变更转座体的用量，也可以在片段化反应中添加1-5 mM的Mg^{2+}离子（$MgCl_2$）。

2.3 片段纯化

上步所得片段可以用试剂盒或者磁珠进行纯化。如果片段不经纯化直接进行PCR富集，片段中的转座酶可能会影响PCR过程。

2.4 PCR富集

PCR富集步骤包括缺刻平移和PCR循环，缺刻平移步骤一般为72°C、3分钟，PCR循环数根据初始DNA的量来确定，一般进行5-15个循环。PCR富集的产物经纯化等步骤后可上机进行测序。